

Άλφα<sub>2B</sub> - αδρενεργικοί υποδοχείς στα αιμοπετάλια ασθενών με στεφανιαία νόσο: Η επίδραση της αναστολής τους στη συγκόλληση των αιμοπεταλίων

**Μ.Τουλουπάκη**, Μ.Ε. Μαρκέτου, Γ. Κοχιαδάκης, Ν.Ε. Ανδρουλάκης, Κ. Ρούφας, Ι. Κονταράκη, Ι. Λογκάκης, Μ.Γ. Αλεξανδράκης, Φ. Μαραγκουδάκης, Ε. Γαβρά, Χ. Γαβράς, Π.Ε. Βάρδας.

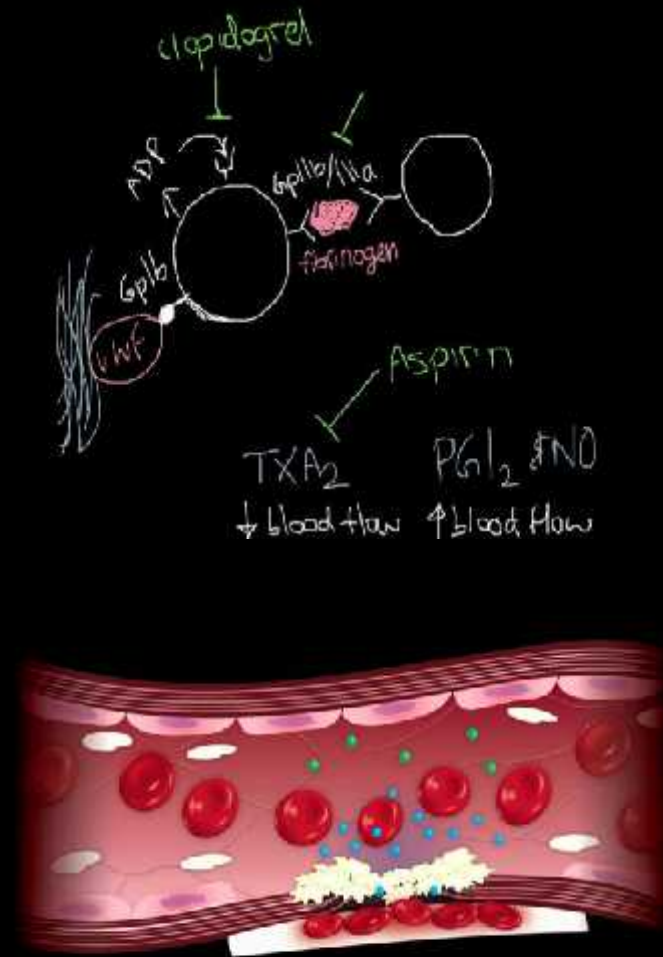
Καρδιολογική κλινική, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου, Κρήτη  
Hypertension and Atherosclerosis Section, Department of Medicine, Boston University School of Medicine, Boston, Massachusetts, USA

A 3D medical illustration of a blood vessel, showing a cross-section of the vessel wall and several red blood cells. The red blood cells are depicted as biconcave discs, with some showing their characteristic shape. The vessel lumen is on the right, and the vessel wall is on the left. The overall color scheme is dominated by reds and oranges, with a white text overlay in the center.

No conflict of interest

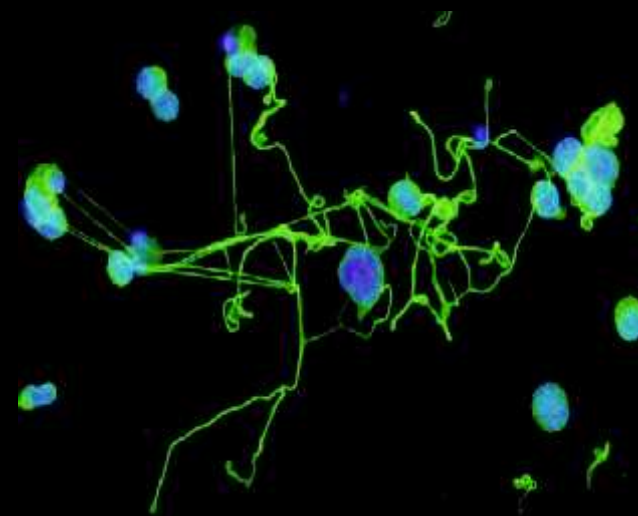
# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- Η **ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων** (PLTs) αποτελεί τη βασική προϋπόθεση στην παθοφυσιολογία της δημιουργίας του θρόμβου και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο τόσο στις **αρτηριακές θρομβώσεις** όσο και στην **πρόοδο της αθηρωματικής νόσου**.
- Αν και τα υπάρχοντα **αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα** είναι σχετικά ασφαλή και αποτελεσματικά, το θέμα της **“υπολειπόμενης ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων”** σε ασθενείς που ήδη λαμβάνουν αντιαιμοπεταλιακά αποτελεί μεγάλο κλινικό πρόβλημα και κυρίαρχο θέμα στη βιβλιογραφία.
- Σε αυτούς τους ασθενείς μια πιθανή λύση θα ήταν να στοχεύσει κανείς σε **άλλα μονοπάτια της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων** από αυτά που στοχεύουν τα ήδη υπάρχοντα φάρμακα



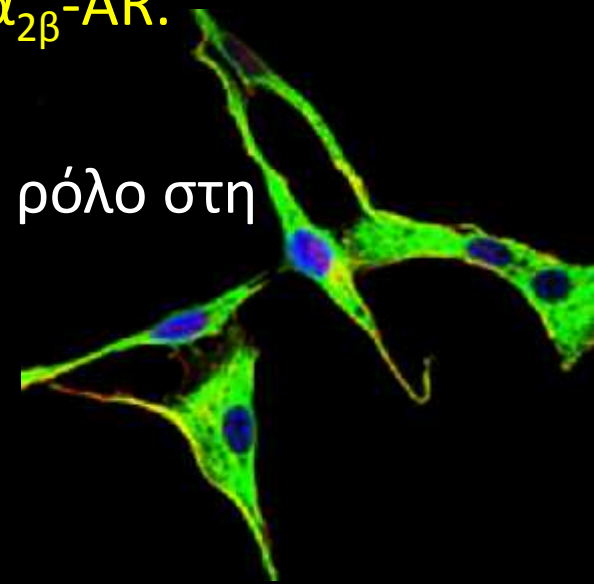
# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- Η **ενεργοποίηση του συμπαθητικού νευρικού συστήματος** είναι ένας άλλος παράγοντας που συμμετέχει στη παθοφυσιολογία των θρομβωτικών επεισοδίων
- Προηγούμενες μελέτες σε ανθρώπους έχουν δείξει ότι οι  $\alpha_2$ -αδρενεργικοί **υποδοχείς ( $\alpha_2$ -ARs)**, ίσως παίζουν κάποιο ρόλο στη **συγκόλληση των αιμοπεταλίων** και την **αρτηριακή θρόμβωση**
- Είναι γνωστό από παλαιότερα ότι οι **κατεχολαμίνες** παίζουν σημαντικό ρόλο στη **θρομβογένεση** και ότι η **επίδρασή τους στη συγκολλητικότητα των αιμοπεταλίων προάγεται κυρίως μέσω των  $\alpha_2$ -ARs**.
- Η **επινεφρίνη** φαίνεται ότι οδηγεί και προάγει την **ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων** μέσω και της **αύξησης του παράγοντα von Willebrand** αλλά και της **αλληλεπίδρασης αιμοπεταλίων και κολλαγόνου**. Ωστόσο, οι ακριβείς μηχανισμοί δεν έχουν πλήρως ξεκαθαρισθεί.



## ...Τυχαίο εύρημα

- Το ενδιαφέρον μας για το θέμα αυτό προέκυψε από ένα τυχαίο εύρημα: κατά τη διάρκεια των πειραματικών μελετών σε ζώα για τη διερεύνηση του ρόλου του  $\alpha_{2\beta}$ -AR σε μοντέλα με υπέρταση εξαρτώμενη από τη λήψη άλατος, παρατηρήσαμε **εκσεσημασμένη τάση για αιμορραγία σε ζώα των οποίων η υπεραδρενεργική κατάσταση καταργήθηκε με εκλεκτική αναστολή του  $\alpha_{2\beta}$ -AR.**
- Υποθέσαμε ότι οι  $\alpha_{2\beta}$ -AR μπορεί να έχουν ένα κρίσιμο ρόλο στη θρομβογένεση.

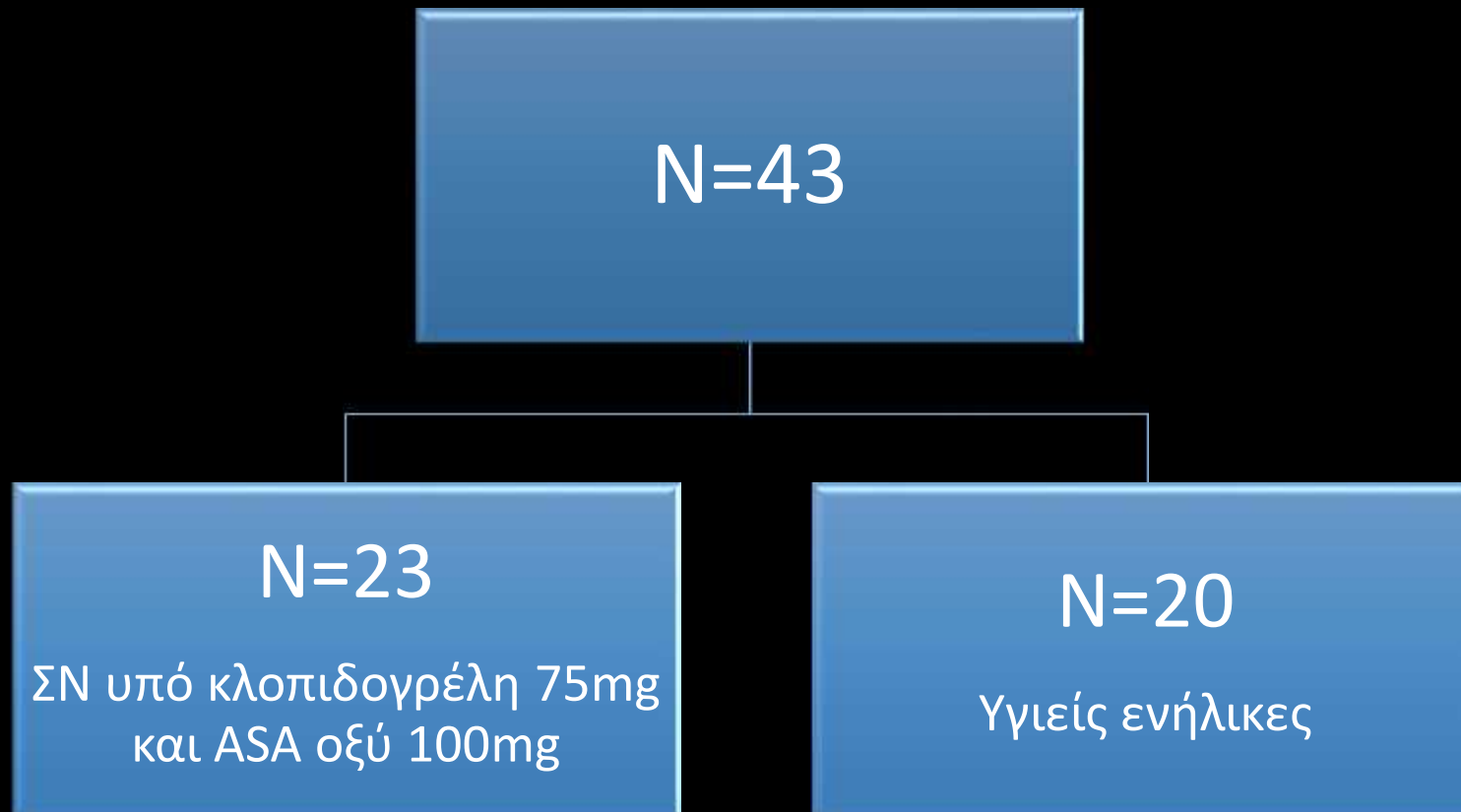




# Σκοπός

Εξετάζουμε την ύπαρξη και το ρόλο των άλφα<sub>2B</sub> – αδρενεργικών υποδοχέων ( $\alpha_{2B}$ -ARs) στα αιμοπετάλια ασθενών με στεφανιαία νόσο (ΣΝ) σε σύγκριση με υγιείς ενήλικες.

# Υλικά και μέθοδοι



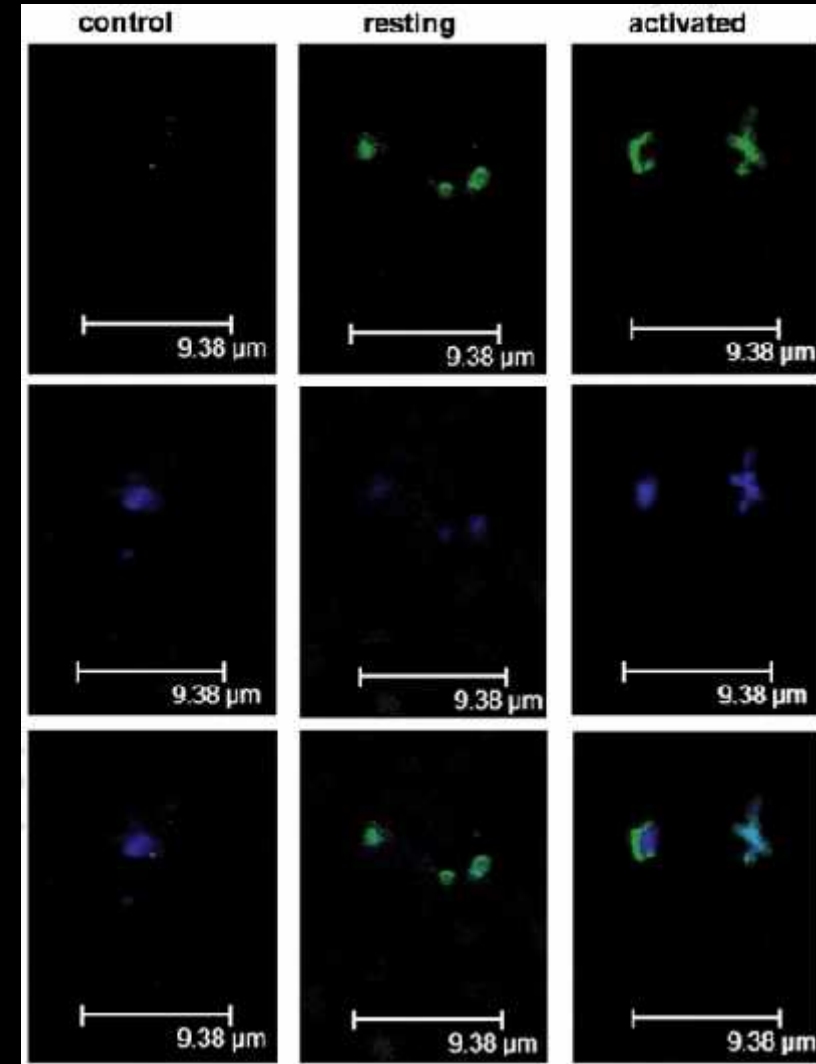
# Υλικά και μέθοδοι

- Ελήφθησαν δείγματα αίματος από τα οποία απομονώθηκαν τα αιμοπετάλια.
- Η έκφραση των  $\alpha 2B-ARs$  στα αιμοπετάλια υπολογίστηκε με **RT-PCR** κι επιβεβαιώθηκε επιπλέον με **Western blot analysis**.
- Προκειμένου να μελετήσουμε τη **λειτουργία** τους, πραγματοποιήσαμε μελέτη συγκόλλησης αιμοπεταλίων - **συσσωματομετρία φωτός** (light transmittance aggregometry) εξετάζοντας τα ανασταλτικά αποτελέσματα μονοκλωνικών αντισωμάτων στους  $\alpha 2B-AR$ .



## Έκφραση των $\alpha 2b$ -ARs στα αιμοπετάλια

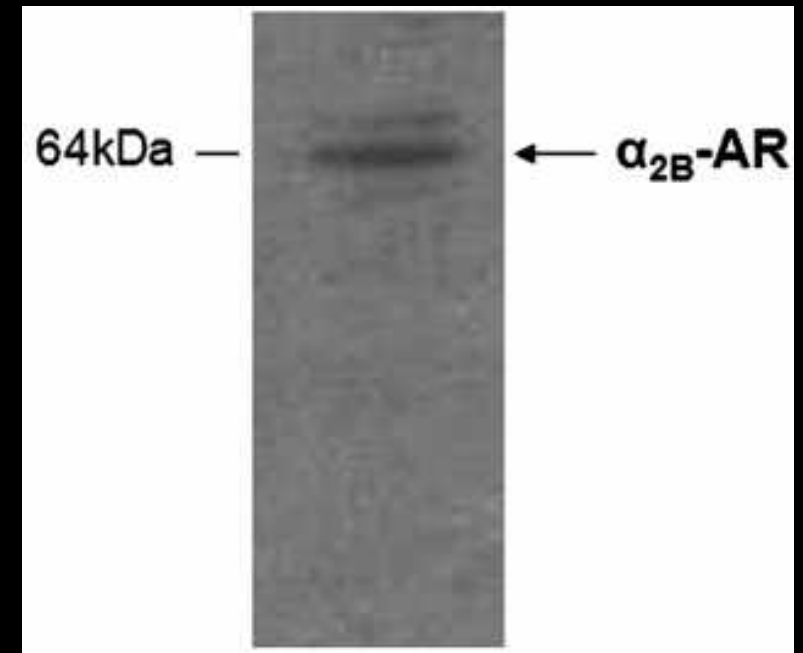
- Εικόνες από ομοεστιακό μικροσκόπιο: χρώση διπλού ανοσοφθορισμού
  - πρωτογενές αντίσωμα :  $\alpha 2b$ -AR Ab
  - δευτερογενές αντίσωμα: Alexa Fluor 488
- Οι  $\alpha 2b$ -AR εκφράζονται σε μη ενεργοποιημένα και σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια



Πάνω πίνακας: χρώση Alexa Fluor 488 (πράσινη),  
Μεσαίος πίνακας: To-Pro 3 iodide χρώση (μπλε),  
Κάτω πίνακας: Συγχώνευση

## Western blot ανάλυση Έκφραση των $\alpha_2\text{B-ARs}$ στα αιμοπετάλια

- Μελετήθηκαν τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης με την τεχνική Western blot.
- Το σύνολο των πρωτεϊνών επωάστηκε με ειδικά αντισώματα για τους  $\alpha_2\text{B-AR}$ , ( $\alpha_2\text{B-AR Abs}$ ).

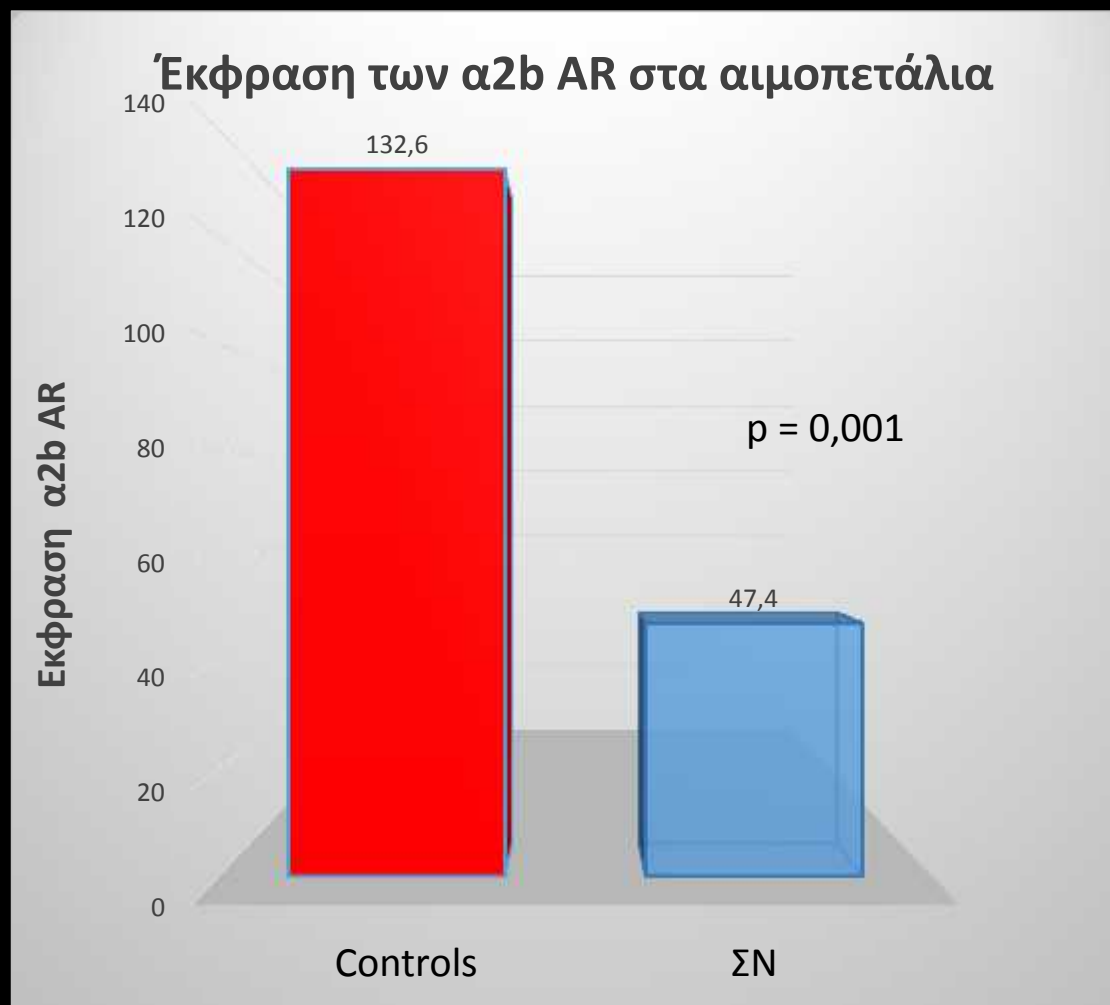


## Δοκιμασία συσώρευσης αιμοπεταλίων

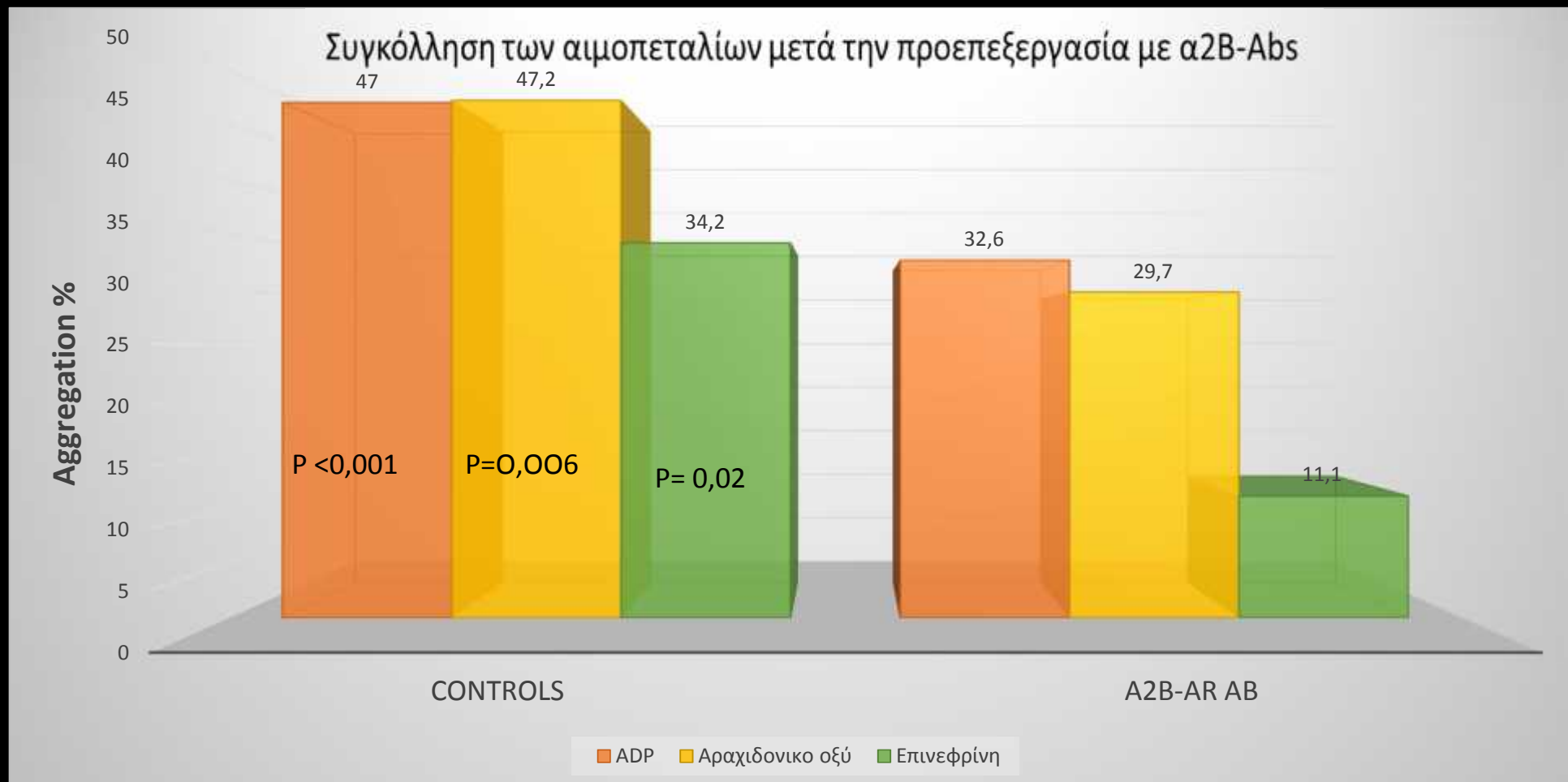
- Σε κάθε ασθενή έγινε μελέτη συγκόλλησης αιμοπεταλίων με **ADP, επινεφρίνη** (αδρεναλίνη) κι **αραχιδονικό οξύ**.
- Για τη δοκιμασία ελήφθησαν **15-20 ml ολικού αίματος** το οποίο μοιράζεται σε σωληνάκια με Κιτρικό Νάτριο 0,11 N ως αντιπηκτικό.
- Έτσι μετρήσαμε εργαστηριακά την **ικανότητα συσώρευσης** με ειδικούς αυτόματους αναλυτές, τα συσσωρόμετρα (**aggregometers**).
- Η μέθοδος στηρίζεται στην αρχή ότι ο σχηματισμός σωρών από αιμοπετάλια, μετά από προσθήκη ουσίας, προκαλεί ελάττωση της φυσιολογικής θολερότητας του πλάσματος, καθιστώντας έτσι ευχερέστερη τη δίοδο φωτεινής δέσμης μέσω αυτού.

# Αποτελέσματα

- Διεπιστώθη σημαντικά μειωμένη έκφραση του υποδοχέα  $\alpha 2\beta$  στα αιμοπετάλια των ασθενών με ΣΝ
- ( $132,6 \pm 90,8$  σε φυσιολογικούς έναντι  $47,4 \pm 19,7$ ,  $p = 0,001$ ).



# Αποτελέσματα



# Αποτελέσματα

- Στους ασθενείς με **ΣΝ** παρατηρήθηκε **σημαντικά μειωμένη έκφραση του υποδοχέα α2B** στα αιμοπετάλια ( $132,6 \pm 90,8$  σε φυσιολογικούς έναντι  $47,4 \pm 19,7$ ,  $p = 0,001$ ).
- Η προεπεξεργασία με **αντισώματα κατά των α2B υποδοχέων (α2B –Abs)** είχε ως αποτέλεσμα **σημαντική περαιτέρω μείωση της συγκόλλησης των αιμοπεταλίων**.
- Το πλούσιο σε αιμοπετάλια πλάσμα (PRP) στο οποίο είχε πραγματοποιηθεί **προσθήκη ADP**, εμφάνισε σημαντική μείωση στη συγκόλληση των αιμοπεταλίων μετά την προεπεξεργασία με α2B-Abs ( $47 \pm 5,8\%$  για την ομάδα ελέγχου έναντι  $32,6 \pm 3,9\%$  για την ομάδα με α2B-Abs προεπεξεργασία,  $p < 0.001$ ).
- Όταν χρησιμοποιήθηκε **αραχιδονικό οξύ σε PRP**, η προεπεξεργασία με α2B –Abs επίσης ελάττωσε τη συγκόλληση των αιμοπεταλίων από  $47,2 \pm 9,3\%$  σε  $29,7 \pm 8,9\%$ , ( $p = 0,006$ ).
- Παρομοίως, η παρουσία α2B-Abs ελάττωσε την προκαλούμενη από την **επινεφρίνη** συγκόλληση των αιμοπεταλίων από  $34,2 \pm 12,1\%$  σε  $11,1 \pm 7,2\%$  ( $p = 0,02$ ).



# Συμπεράσματα

- Οι ασθενείς με ΣΝ υπό διπλή αντιαιμοπεταλιακή αγωγή, εμφανίζουν μειωμένη έκφραση του γονιδίου των  $\alpha_2\beta$ -ARs υποδοχέων στα αιμοπετάλια, συγκρινόμενοι με φυσιολογικούς ενήλικες.
- Η αναστολή των υποδοχέων  $\alpha_2\beta$ -ARs στα αιμοπετάλια, ίσως αποτελεί μια νέα θεραπευτική επιλογή για την πρόληψη των αθηροθρομβωτικών συμβαμάτων.
- Είναι ενδιαφέρον, ότι ακόμη και σε ασθενείς με ΣΝ που λαμβάνουν διπλή αντιαιμοπεταλιακή αγωγή, με ασπιρίνη και κλοπιδογρέλη, η αναστολή των  $\alpha_2\beta$ -ARs υποδοχέων είχε επιπλέον αντισυγκολλητικό αποτέλεσμα.



**ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ!**